



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

Evaluación de un consorcio de Bacillus aisladas del manglar de Puerto Hualtaco para reducir la materia orgánica en sedimentos acuícolas

**ROMERO REQUELME ARIANA JARETH
INGENIERA ACUICOLA**

**GUALAN SALINAS JOHANNA MARGARITA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**Evaluación de un consorcio de *Bacillus* aisladas del manglar de
Puerto Hualtaco para reducir la materia orgánica en sedimentos
acuícolas**

**ROMERO REQUELME ARIANA JARETH
INGENIERA ACUICOLA**

**GUALAN SALINAS JOHANNA MARGARITA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**Evaluación de un consorcio de Bacillus aisladas del manglar de
Puerto Hualtaco para reducir la materia orgánica en sedimentos
acuícolas**

**ROMERO REQUELME ARIANA JARETH
INGENIERA ACUICOLA**

**GUALAN SALINAS JOHANNA MARGARITA
INGENIERA ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2024**



Revisión de Tesis

Estudiante

2%
Textos sospechosos



1% Similitudes
0% similitudes entre comillas
0% entre las fuentes mencionadas
< 1% Idiomas no reconocidos

Nombre del documento: Revisión Tesis.pdf
ID del documento: b2a347ab304e80017e906d6f0dcfdd1825a8041f
Tamaño del documento original: 623,61 kB
Autor: Ariana Romero Requelme

Depositante: Ariana Romero Requelme
Fecha de depósito: 24/1/2025
Tipo de carga: url_submission
fecha de fin de análisis: 24/1/2025

Número de palabras: 6175
Número de caracteres: 40.317

Ubicación de las similitudes en el documento:

Fuente principal detectada

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 repositorio.utmachala.edu.ec https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/21039/1/Trabajo_Titulacion_1554.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (53 palabras)

Fuente con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 repositorio.esпам.edu.ec http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/677/1/TMA156.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (11 palabras)

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, ROMERO REQUELME ARIANA JARETH y GUALAN SALINAS JOHANNA MARGARITA, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado Evaluación de un consorcio de Bacillus aisladas del manglar de Puerto Hualtaco para reducir la materia orgánica en sedimentos acuícolas, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



ROMERO REQUELME ARIANA JARETH

0750335069



GUALAN SALINAS JOHANNA MARGARITA

0750781593

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado, en primer lugar, a Dios, quien ha sido mi guía, mi fortaleza y mi refugio en los momentos más difíciles. Su presencia ha estado conmigo en cada paso de este camino, dándome la sabiduría, las bendiciones y la fuerza necesaria para superar cada desafío.

También dedico este logro a mis padres, especialmente a mi padre Antonio Gualán, cuyo amor incondicional, apoyo inquebrantable, esfuerzo y sacrificio han sido la base de cada uno de mis logros e inspiración. Todo lo que soy ahora se lo debo a él.

A mi hermana Yelenny Gualán, mis sobrinas Dallys, Dayanara y a mi bella Ángela Samira por su alegría y amor, sus palabras de aliento y apoyo incondicional, durante este proceso y en los momentos difíciles, gracias por estar siempre conmigo en todo momento, por ser mi fortaleza y alegrarse por mí en cada logro alcanzado, recordándome siempre el valor y amor de la familia.

A mis fieles compañeros de cuatro patas, que con su lealtad, alegría y compañía silenciosa hicieron de esta larga trayectoria algo más llevadero. Sus miradas llenas de amor y su inagotable energía fueron un recordatorio constante de que, sin importar los desafíos, siempre hay un motivo para seguir adelante (A.,CH.,K.,L.,T.,K.,T.)

Y, finalmente, a una persona muy especial e importante en mi vida, mi enamorado, cuyo apoyo incondicional ha sido un pilar fundamental en este proceso. Gracias por estar siempre para mí, por brindarme tu confianza, cariño y compañía en cada momento.

Johanna Margarita Gualán Salinas

Este trabajo se lo dedico, primeramente, de manera especial a Dios y a la Virgen, que siempre han estado presentes en mi vida.

Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles a ellos este trabajo.

A mis padres, especialmente a mi madre, que ha sido mi pilar fundamental para seguir adelante. Gracias a ella por confiar en mí y en mi deseo de superación.

A mi pareja, por depositar su confianza en cada reto que se me presentaba, sin dudar ni un momento de mi capacidad.

Y sin olvidar a mis seres queridos más cercanos, por alentarme a seguir adelante y por permitirme ser parte de su orgullo.

Por todos ellos, soy gran parte de lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

Ariana Jareth Romero Requelme

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por darme la fortaleza, sabiduría y paciencia necesaria para superar cada desafío que se presentó durante este proceso. Sin su guía divina, este logro no habría sido posible.

A mi papá, gracias por confiar en mí, por apoyarme en mi sueño de superación, por tus consejos y por apoyarme incondicionalmente en cada paso del camino. Tu amor y constante respaldo han sido mi mayor fortaleza. Me llena de emoción ver que cada esfuerzo y sacrificio que has hecho han valido la pena. Saber que todo el trabajo, las dificultades y las noches de desvelo han dado fruto me hace sentir profundamente agradecida. Decirte: "*¡Papá, lo logré!*" es una de las mayores satisfacciones de mi vida, porque este logro no es solo mío, sino también tuyo.

A mi hermana, por siempre estar dispuesta a escucharme y brindarme su apoyo; a mis sobrinas, por ser mi fuente constante de alegría y motivación y a mi enamorado, por su apoyo constante, comprensión y amor, que me motivaron a seguir adelante en todo momento.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora de tesis, la Dra. Lita Sorroza, por su orientación, paciencia y dedicación en cada fase de este proyecto. Su experiencia y apoyo fueron cruciales para llevar a cabo este trabajo.

A mi compañera de tesis, por su valiosa amistad, trabajo en equipo y por estar siempre disponible para compartir ideas y soluciones.

Al Ing. Irán Rodríguez, por su valiosa colaboración y consejos que contribuyeron significativamente al desarrollo de este estudio. Agradezco también al Dr. Patricio Rentería, por sus valiosas aportaciones y su disposición para resolver todas mis inquietudes.

Mi gratitud a los especialistas Dra. Leonor Rivera y Dr. Roberto Santacruz, por su generosidad al brindarme su experiencia durante el proceso de revisión de este trabajo.

A la Ing. Ivanna Tuz y la Ing. Karen Miranda, por su enseñanza, paciencia y por siempre estar dispuestas a ayudarme en el manejo de los equipos y procesos experimentales.

Gracias a todos por ser parte de este logro tan significativo en mi vida.

Johanna Margarita Gualán Salinas

Con el corazón lleno de gratitud, elevo mi primer agradecimiento a Dios, fuente de fortaleza y sabiduría, por iluminar mi camino y permitirme crecer, reafirmando en esta etapa de mi vida su amor y presencia eterna. A la vida, por permitirme encontrar en mi sendero a personas valiosas que, con su enseñanza y apoyo, han sido esenciales en cada etapa de mi formación.

A mi tutora, la Dra. Lita Scarlett Sorroza Ochoa, mi más sincero reconocimiento por su paciencia, dedicación y guía constante. Su apoyo ha sido fundamental para la culminación de este trabajo, y sus enseñanzas quedarán grabadas en mi trayectoria profesional y personal.

A la Dra. Leonor Margarita Rivera Intriago y al Dr. Roberto A. Santacruz Reyes, gracias por su tiempo, compromiso y por compartir su conocimiento con generosidad.

Al Dr. Jorge Patricio Rentería Minuche, por su ayuda y claridad en cada orientación han sido esenciales para la consolidación de este proyecto.

A las Ingenieras Ivanna Tuz y Karen Miranda, gracias por su paciencia, por su colaboración y por facilitar el desarrollo de este trabajo.

A mi compañera de tesis, con quien compartí largas horas de esfuerzo, desafíos y aprendizajes. Gracias por tu dedicación, compromiso y entrega en cada etapa de este camino. Juntas enfrentamos retos y superamos obstáculos, y hoy celebramos este logro con orgullo.

Agradezco cada experiencia vivida, tanto los momentos de felicidad como los de dificultad, pues han sido el motor que me impulsó a seguir adelante. A quienes formaron parte de este recorrido, a quienes se emocionaron y lloraron conmigo, a quienes me brindaron su apoyo incondicional, sus consejos y su motivación en los momentos más desafiantes, les debo una parte fundamental de este triunfo.

A mis padres, gracias infinitas. A mi madre, Maribel, por su paciencia inagotable, su sacrificio y su amor incondicional. A ambos, por ser mi pilar fundamental, por no permitirme rendir cuando las fuerzas flaqueaban, por enseñarme que los sueños se alcanzan con esfuerzo y perseverancia.

De manera especial, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi pareja, mi compañero incondicional, quien ha estado a mi lado en cada paso, brindándome su amor, paciencia y aliento en los momentos de mayor exigencia. Su presencia ha sido un refugio y una fortaleza en este proceso.

A todos ustedes, les entrego mi gratitud más profunda y sincera. Después de tanto esfuerzo y dedicación, hoy puedo decir: ¡lo logramos!

Ariana Jareth Romero Requielme

RESUMEN

La intensificación de la producción acuícola genera acumulación de sedimento, lo que representan un grave problema para este sector. Por esta razón, el objetivo de este trabajo experimental fue evaluar el efecto de un consorcio de cepas de *Bacillus spp.* aisladas del manglar en la degradación de materia orgánica, acumulada en los sedimentos de piscinas camaroneras a baja salinidad. Las cepas de *Bacillus spp.* se cultivaron en peptona de soya al 4 % durante 72 h para alcanzar una concentración bacteriana de 10^9 ufc/ml. El diseño experimental fue completamente al azar (DCA), con tres tratamientos de una mezcla de bacterias y la adición de nutrientes como nitrógeno y fósforo (T1 12 μ L, T2 18 μ L y T3 24 μ L) además de un control sin aplicación de insumos, cada uno con tres repeticiones. El experimento tuvo una duración de 20 días, durante los cuales se analizaron el porcentaje de materia orgánica (método Walkley & Black), la concentración de nitrógeno total (Sistema de Kjeldahl) que se mantuvo estable durante todo el experimento, y la concentración de fósforo (espectrofotometría UV-Visible) que disminuyó en el T1. Los resultados indican que existe diferencias significativas (p -valor < 0,05) en la reducción de materia orgánica, con una disminución promedio del 2.54% en el T3. Este estudio concluyó que el uso de *Bacillus spp.* constituye una estrategia eficaz para la reducción de materia orgánica en sedimentos acuícolas a baja salinidad, contribuyendo a la gestión sostenible de estos sistemas.

Palabras Clave: Biorremediación, *Bacillus spp.*, Materia orgánica, bacterias, y camarón.

ABSTRACT

The intensification of aquaculture production generates sediments accumulation, that represent a serious problem for this sector. For this reason, the objective of this experimental work was to evaluate the effect of a consortium of *Bacillus spp.* strains isolated from mangroves on the degradation of organic matter accumulated in the sediments of shrimp ponds at low salinity. *Bacillus spp.* strains were massaged in 2% soy peptone for 72 h to reach a bacterial concentration of 10⁹ cfu/ml. The experimental design was completely randomized (CRD), with three treatments of a mixture of bacteria and the addition of nutrients such as nitrogen and phosphorus (T1 12 µL, T2 18 µL and T3 24 µL) plus a control without application of inputs, each with three replicates. The experiment lasted 20 days, during which the percentage of organic matter (Walkley & Black method), the concentration of total nitrogen (Kjeldahl system), which remained stable throughout the experiment, and the concentration of phosphorus (UV-Visible spectrophotometry), which decreased in T1, were analyzed. The results indicate that there are significant differences in the reduction of organic matter according to the doses of the bacterial consortium, with an average decrease of 3.86%. This study concluded that the use of *Bacillus spp.* constitutes an effective strategy for the reduction of organic matter in aquaculture sediments at low salinity, contributing to the sustainable management of these systems.

Key Words: Bioremediation, *Bacillus spp.*, organic matter, bacteria, and shrimp.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
METODOLOGÍA	7
Ubicación del Experimento	7
Diseño Experimental.....	7
Modelo Matemático (Diseño Completamente al Azar)	8
Tratamientos Aplicados en el Experimento.....	8
Variables a Medir	9
Variable Dependiente:	9
Variables Intervinientes:	9
Ensayo Experimental	9
RESULTADOS	13
Curva de Crecimiento del Consorcio Bacteriano	13
Análisis de los Parámetros Físico-Químicos Tomados en el Sedimento	14
Efecto del Consorcio Bacteriano a Base de <i>Bacillus spp.</i> en Materia Orgánica (MO).....	14
Análisis de Nitrógeno Total y Fósforo del Sedimento	17
DISCUSIONES	19
Curva de Crecimiento	19
Estadísticos descriptivos del porcentaje de MO en el sedimento tratado con diversas dosis del consorcio bacteriano.	20
ANOVA de un factor entre grupos para comparar las concentraciones de MO entre las diferentes dosis del consorcio bacteriano de <i>Bacillus spp.</i>	20
Efecto de Diferentes Dosis del Consorcio Bacteriano Sobre el Contenido de MO en Muestras de Sedimento de Piscina Camaronera en un Modelo in Vitro	21
Análisis de Nitrógeno Total y Fósforo del Sedimento	21
CONCLUSIONES.....	22

RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	33
Anexo 1: Método para Contabilizar las Bacterias por el Método de la Cámara de Neubauer.	33
Anexo 2: Método para Determinar el Nitrógeno total de las Muestras de Sedimento	34
Anexo 3: Método para Determinar el Fósforo de las Muestras de Sedimento	36
Anexo 4: Método de Walkley & Black para Determinar la Materia Orgánica	37
Anexo 5: Método para Determinar el pH del Sedimento Acuícola	38

INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha crecido rápidamente en los últimos años, incluso más que la pesca de captura y se anticipa que esta tendencia continúe en aumento (Gonzabay *et al.*, 2021). Según la Cámara Nacional de Acuicultura (2024), Ecuador es uno de los principales productores y exportadores de camarón, alcanzó un récord histórico de exportación mundial de 1,2 millones de toneladas métricas en 2024, lo que representa más del 40% de las exportaciones ecuatorianas. El camarón blanco es una de las especies más cultivadas a nivel mundial, y Ecuador destaca como uno de los principales productores y exportadores, reconocido por su alta calidad, textura y sabor (López-López *et al.*, 2023).

La intensificación de la producción acuícola genera sedimentos que representan un grave problema, debido a que los lodos o residuos orgánicos contienen fósforo, compuestos nitrogenados y carbono orgánico disuelto. Estos provienen de alimento no consumido, zooplancton, fitoplancton, animales muertos, exoesqueletos y excretas en el estanque. Estas cargas orgánicas desequilibran el cultivo cuando su aporte excede la capacidad natural del mismo para reciclar nutrientes, convirtiéndose en un problema para la producción (Drózd *et al.*, 2020).

Según Lopes (2021), investigaciones han evidenciado la eficacia de los *Bacillus spp.* como agentes biorremediadores, resaltando su papel fundamental en el mantenimiento de los niveles adecuados de oxígeno, su participación en el ciclo del nitrógeno a través de procesos como la nitrificación y la desnitrificación, así como su capacidad para degradar eficientemente los residuos orgánicos presentes en el ambiente.

Asimismo, Soltani *et al.* (2019) afirman que estas bacterias regulan la población de la microbiota beneficiosa en los sistemas acuáticos, caracterizados por controlar microorganismos patógenos y potenciar la descomposición de sustancias orgánicas. Además, estudios han demostrado la eficiencia de algunas especies de *Bacillus spp.* para mejorar la calidad tanto del agua como del suelo. Estos estudios sugieren que *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus coagulans* son adecuados para la biorremediación de residuos orgánicos.

Por otro lado, Mendes (2021) evaluó los efectos de los biorremediadores *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* en suelos de estanques de policultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*), encontrando que la aplicación de estas cepas en suelos de granjas camaroneras reduce los niveles de materia orgánica, carbono oxidable y acidez, lo que sugiere un gran potencial para la remediación ambiental. Además, estas bacterias modulan el microbioma del suelo, promoviendo un aumento en la riqueza y diversidad de especies.

Estas investigaciones indican que la utilización de cepas de *Bacillus spp.* es una técnica efectiva de biorremediación, ya que estas bacterias degradan eficientemente los desechos orgánicos, posicionándose como una herramienta prometedora para la sostenibilidad ambiental.

Este estudio es relevante para la industria acuícola, ya que propone una alternativa biorremediadora que responde a la urgente necesidad de abordar problemas críticos que afectan principalmente a la camaronicultura. Además, se presenta como una solución sostenible y ecológicamente amigable frente a los métodos tradicionales de tratamiento de residuos en acuicultura. Por lo tanto, la finalidad de esta investigación es evaluar la capacidad de un consorcio de cepas de *Bacillus spp.* para degradar la materia orgánica presente en el sedimento de los estanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

Kim *et al.* (2021) señalan que el rápido desarrollo de la industria acuícola ha generado amenazas al medio ambiente costero debido al incremento en la descarga de desechos orgánicos y nutrientes inorgánicos en los ecosistemas acuícolas. Aunque muchos países han implementado estándares ambientales para una acuicultura sostenible, la posibilidad de contaminación grave sigue siendo una preocupación.

En los ecosistemas acuícolas, es común encontrar un exceso de materia orgánica (MO) que se acumula por varios factores como las altas densidades de población en los sistemas de cultivo. Esta acumulación incluye desechos de nitrógeno y fósforo, que pueden alcanzar niveles del 3% y el 16% en los sedimentos. Dicha acumulación puede causar eutrofización y una mayor demanda de oxígeno disuelto, afectando el bienestar y el desarrollo de los organismos, entre otros. Además, el reciclaje de la materia orgánica en los sedimentos provoca bajos niveles de oxígeno, condiciones

de hipoxia o anoxia, lo que reduce la variedad de organismos bentónicos, incluidas las comunidades bacterianas más adaptables, afectando el equilibrio ecológico. Los cultivos semi-intensivos e intensivos muestran los niveles más altos de materia orgánica (Burbano-Gallardo *et al.*, 2021).

Allard *et al.* (2020) indican que los manglares, ubicados a lo largo de las costas, son puntos calientes de productividad y biodiversidad que desempeñan un papel crucial en la biogeoquímica y el ciclo de nutrientes, gracias al microbioma compuesto por bacterias, arqueas, hongos y protistas presentes en los sedimentos, la columna de agua y en los tejidos, así como sobre ellos. Estas cepas bacterianas han demostrado un gran potencial para adaptarse a la salinidad y eliminar metales pesados (cadmio y zinc), utilizando mecanismos biológicos que les permiten precipitar o bioacumular estos desechos, reduciendo su toxicidad en el medio ambiente.

Los microorganismos juegan roles cruciales en los estanques de cultivo, ya que ayudan a mantener el equilibrio ecológico en los estanques, promoviendo un ambiente saludable para el crecimiento de los camarones. Además, su actividad contribuye a la sostenibilidad del cultivo al mejorar la eficiencia del sistema de producción (Prasad *et al.*, 2021; Shivalkar *et al.*, 2021). Estos microorganismos pueden descomponer y convertir la materia orgánica en compuestos menos complejos y menos perjudiciales. Esta capacidad es crucial para prevenir la acumulación de residuos tóxicos en los ecosistemas acuáticos (Hlordzi *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021).

La materia orgánica está compuesta por carbono, ligninas y proteínas, que son degradadas por microorganismos, y descompuestas en dióxido de carbono (CO₂). Al final de un ciclo de cultivo, se ha encontrado que hasta un 30% del alimento no aprovechado por los organismos cultivados se convierte en materia orgánica en el fondo del estanque (Colette *et al.*, 2023; Navarrete *et al.*, 2022). Esta acumulación de materia orgánica puede generar efectos adversos como la creación de zonas anaerobias, la liberación de nutrientes y la proliferación de microorganismos indeseables, lo que deteriora la calidad del agua y afecta parámetros como el pH y el oxígeno disuelto (Hasibuan *et al.*, 2023).

El exceso de desechos orgánicos, fósforo y nitrógeno, en el fondo del estanque provoca un deterioro progresivo de la calidad del suelo, lo cual afecta negativamente la calidad del agua, el crecimiento de los organismos y la producción en general. Estas cargas desequilibran el ecosistema cuando su aporte excede la capacidad natural del mismo para reciclar nutrientes, convirtiéndose en un problema para el cultivo (Drózd *et al.*, 2020; Hasibuan *et al.*, 2023).

Para asegurar un cultivo sostenible, es esencial aplicar prácticas de manejo adecuadas, como optimizar las raciones de alimento y realizar monitoreos regulares de los parámetros del agua y del suelo (Guerrero, 2023). El porcentaje de materia orgánica en el sedimento de los estanques acuícolas no debe superar el 3 - 4 %, ya que niveles más altos pueden dar lugar a condiciones anaeróbicas y acumulación de compuestos tóxicos (Tucker & Hargreaves, 2009).

La biorremediación es un proceso que utiliza microorganismos para transformar compuestos biodegradables en sedimentos contaminados en productos menos nocivos. Esta técnica, desarrollada en la década de 1960 por George M. Robinson, emplea el uso de bacterias, hongos o plantas para degradar desechos tóxicos (Barman, 2020). Existen dos enfoques principales: la bioestimulación, que consiste en la adición de nutrientes para estimular el crecimiento microbiano, y la bioaumentación, que implica la introducción de cepas microbianas específicas (Castro, 2021).

El proceso de biorremediación depende de factores como la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno y los nutrientes esenciales para su crecimiento, estos factores afectan la eficacia de los microorganismos en la descomposición de los contaminantes (Alori *et al.*, 2022; Mishra *et al.*, 2021). La temperatura y pH son determinantes en la actividad bacteriana, ya que cada microorganismo tiene un rango óptimo para su desarrollo (Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018; Soltani *et al.*, 2019).

Las bacterias del género *Bacillus* son especialmente útiles en la biorremediación debido a su capacidad para formar esporas, lo que les permite resistir condiciones extremas (Chaverra-Garcés, 2022). La utilización de *Bacillus spp.* mejora tanto la calidad de los sedimentos como la del agua, disminuyendo los niveles tóxicos de compuestos nitrogenados y fósforo (Chaverra-Garcés, 2022).

La selección adecuada de cepas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, es crucial para maximizar la eficiencia del proceso de biorremediación (Colette *et al.*, 2023). Estos microorganismos, a través de procesos enzimáticos, no solo transforman y degradan una amplia gama de residuos orgánicos, sino que también contribuyen a la restauración de suelos utilizados para la actividad acuícola (Husain *et al.*, 2022; Pal *et al.*, 2020).

La incorporación de *Bacillus spp.* en la biorremediación no solo mejora la calidad ambiental, sino que también favorece el crecimiento de especies acuáticas al mejorar condiciones del sedimento y el agua (Pedraza *et al.*, 2020). Estos microorganismos pueden formar biopelículas, lo que les proporciona ventajas adaptativas en ambientes adversos, permitiendo su colonización y facilitando la degradación de contaminantes (Galicia-Jiménez *et al.*, 2011).

Para cultivar estas bacterias, se utilizan medios de cultivo con fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes esenciales que permitan el crecimiento óptimo de las bacterias (Correa *et al.*, 2023; Rodríguez *et al.*, 2021). Los *Bacillus spp.*, debido a su capacidad para formar endosporas y su versatilidad metabólica, son una opción prometedora para la biorremediación y el tratamiento de sedimentos en acuicultura y otros ecosistemas contaminados (Chhetri *et al.*, 2022; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de un consorcio de cepas de *Bacillus spp.* aisladas del manglar en la degradación de materia orgánica, acumulada en los sedimentos de piscinas camaroneras a baja salinidad.

Objetivos Específicos

1. Masificar las cepas de *Bacillus spp.* aisladas del manglar en condiciones de laboratorio para obtener una concentración bacteriana dentro del rango aceptable.
2. Comprobar el efecto del consorcio de cepas de *Bacillus spp.* en los sedimentos de piscinas camaroneras.
3. Determinar la dosis de mejor eficiencia del consorcio bacteriano en el contenido de materia orgánica.

METODOLOGÍA

Ubicación del Experimento

El presente ensayo se realizó en el Laboratorio de Maricultura, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Técnica de Machala, cuya ubicación es El Cambio, con las coordenadas 3.2910443, -79.9141977.

Figura 1 Laboratorio de Maricultura *Ubicación del Laboratorio de Maricultura en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.*



Fuente: Google Maps (2024)

Diseño Experimental

Este trabajo experimental se realizó con un diseño completamente al azar (DCA), debido a que se está investigando el efecto de un factor de estudio (consorcio bacteriano de *Bacillus spp.*). Para ello, se utilizaron bandejas de plástico con una capacidad de 15 litros y dimensiones de 32,5 cm × 24 cm × 20 cm (largo × ancho × alto (Tabla 1). Los recipientes fueron cubiertos con sedimento acuícola de baja salinidad hasta una altura aproximada de 10 cm, sobre el cual se añadieron 5 cm de columna de agua con una salinidad de 2 ppt, del mismo sitio de muestreo de la materia orgánica. Finalmente, se incorporó aireación y un consorcio bacteriano de *Bacillus spp.* con tres tratamientos, como se representa en la (Tabla 2) y uno de control sin nutrientes, cada uno con tres repeticiones, sumando un total de 12 unidades experimentales.

Tabla 1 Distribución de los tratamientos en el experimento

Tratamientos			
T0	T2	T3	T2
T3	T0	T3	T0
T1	T2	T1	T1

Modelo Matemático (Diseño Completamente al Azar)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental

μ =Efecto de la media general

τ_i =Efecto del i-esimo tratamiento

e_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

Tratamientos Aplicados en el Experimento

Los tratamientos en la Tabla 2 muestran los valores utilizados para 780 cm², siguiendo la metodología del trabajo de investigación de Pindo (2022). En dicha investigación se utilizaron dosis basadas en un producto comercial que contiene bacterias del género *Bacillus* a una concentración de 10⁹ ufc/ml, como el BIO.BS.BL. Este producto recomienda aplicar una dosis de 1,5 L/ha para reducir la materia orgánica en sedimentos acuícolas. En el presente trabajo, se establecieron las dosis correspondientes del consorcio de *Bacillus spp.* (µL) para volúmenes equivalentes a 1,5 litros, 2 litros y 3 litros.

Tabla 2 Tratamientos aplicados en el experimento

Tratamientos	Dosis del consorcio	Equivalente (L ha⁻¹)
T0	0	0
T1	12 µL	1,5 L
T2	18 µL	2 L
T3	24 µL	3 L

Variables a Medir

La variable dependiente (MO) se midió en el sedimento de cada una de las unidades experimentales. De igual manera, las mediciones de las variables intervinientes (pH, temperatura y oxígeno disuelto), se llevaron a cabo en el mismo lugar, aunque no forman parte del diseño experimental.

Variable Dependiente:

- **Concentración de materia orgánica:** Variable cuantitativa medida a través del método de Walkley & Black.

Variables Intervinientes:

- **Medición de pH:** Esta variable se registró al inicio y los días de aplicación de bacterias utilizando un potenciómetro.
- **Medición de temperatura:** Esta variable cuantitativa se controló al inicio y los días de aplicación de bacterias con un termómetro digital.
- **Medición de oxígeno disuelto:** Esta variable cuantitativa se midió al inicio y al final utilizando un oxigenómetro.

Ensayo Experimental

Para el cultivo del consorcio bacteriano, compuesto por siete tipos de bacterias del género *Bacillus*, se utilizó un medio nutritivo a base de peptona de soya. La preparación consistió en disolver 2 gramos de peptona de soya en 50 ml de agua destilada en un matraz. Posteriormente, se midió el pH y se ajustó a un rango de 7.5 a 8 mediante la aplicación de ceniza de madera y se verificó utilizando tiras

indicadoras de pH. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 minutos. A partir de una colonia aislada de *Bacillus spp.*, se inoculó en el matraz que contenía el medio líquido esterilizado, el cual se incubó a 30°C durante 72 horas para registrar la curva de crecimiento, en su fase exponencial.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado mediante la evaluación de la turbidez del medio. Para el recuento bacteriano, se utilizó el método de conteo en cámara de Neubauer. Se preparó una dilución seriada utilizando una solución salina al 1%, (1 gramo de NaCl en 100 ml de agua destilada). En tubos de ensayo de 15 mL, se añadieron 9 mL de la solución salina y 1 mL del consorcio bacteriano (solución madre), realizando diluciones seriadas hasta 1:100. Para la contabilización, se siguió la metodología de conteo en la cámara de Neubauer según Caramuti *et al.* (2020), detallado en el Anexo 1.

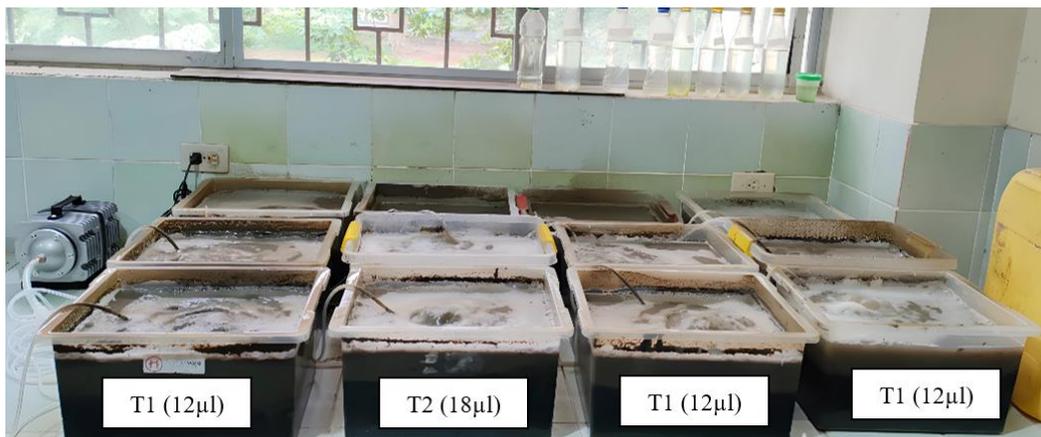
Las muestras de sedimento utilizadas en el experimento se recolectaron un día después de finalizar el ciclo del cultivo en la camaronera 'San Patricio', ubicada en el cantón Santa Rosa, sector 'Sal si puedes', con coordenadas 6°40'21.3"S y 90°79'19.1"W. La recolección se realizó según la metodología de Arias & Zambrano (2022). Para ellos se obtuvo 120 kg de sedimento a una profundidad de 30 cm, almacenados en sacos cubiertos con fundas y el traslado se realizó en baldes previamente desinfectados hasta el lugar del experimento.

En el Laboratorio de Maricultura, las muestras de sedimento (120 kg) se homogenizaron en un tanque de 250 L (Figura 2). Se eliminaron restos calcáreos, y el sedimento se distribuyó en capas de 10 cm de altura, con una columna de agua de 5 cm y aireación constante en cada unidad experimental (Figura 3).

Figura 2 Homogenización de las muestras del sedimento *Proceso de mezcla y uniformización del sedimento recolectado.*



Figura 3 Preparación de las unidades experimentales para el inicio del experimento *Montaje y acondicionamiento de las unidades experimentales antes de iniciar el estudio.*



Durante el proceso de homogenización del sedimento se tomaron muestras iniciales para analizar nitrógeno total, fósforo y materia orgánica. El nitrógeno total se determinó siguiendo la metodología de Jimenez & Quispecahuana (2024), detallada en el Anexo 2. Para la determinación del fósforo, se empleó el método colorimétrico descrito por Arias (2014), cuya metodología se encuentra en el Anexo 3.

Para el análisis de materia orgánica se utilizó la metodología descrita por Barrezueta-Unda *et al.* (2020), detallada en el Anexo 4. Para ello, se recolectaron 300 g de sedimento de los distintos tratamientos, y de cada muestra se procesaron por triplicado, los cuales se distribuyeron en bandejas de aluminio y se secaron durante un período de 48 horas en la estufa a una temperatura de 60 °C como lo indica

Mendes (2021) y Lopes (2021). Luego de este proceso, las muestras fueron trituradas y separadas por un tamiz No. 50, para luego proceder con el análisis de materia orgánica por el método de Walkley & Black.

El consorcio de siete bacterias de *Bacillus spp.* cultivado en condiciones de laboratorio cuenta con una concentración de $1,041 \times 10^9$ UFC/ml en 72 horas, del cual se aplicó en el T1 (12 μ l), T2 (18 μ l) y T3 (24 μ l), que se añadieron cada 5 días junto con 0,20 gramos de fertilizante (DAP) y 0,22 gramos de alimento balanceado (Haid 30% de proteína) como una fuente de nitrógeno. El fertilizante DAP aportó 36 mg de nitrógeno inorgánico (77.31%), mientras que el alimento balanceado contribuyó con 10.56 mg de nitrógeno orgánico (22.69%). Al T0 (control) no se aplicó insumo.

Durante cada suministro, se mantuvieron controlados los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Para la determinación del pH del suelo se siguieron las indicaciones de Sandoval *et al.* (2012), detallado en el Anexo 5.

Para la medición de temperatura se siguió la metodología de Quimí (2024) mediante un termómetro multiparámetro digital y para el registro de oxígeno se lo realizó a través de un medidor de oxígeno disuelto Jbp-70^a, utilizando mg/L (miligramos por litro) como unidad de medida.

Al finalizar el experimento se tomaron muestras para analizar el contenido de nitrógeno total, fósforo y materia orgánica final.

Los datos recolectados se evaluaron mediante ANOVA de un factor intergrupos como prueba paramétrica para comparar las varianzas entre los tratamientos con distintas dosis del consorcio de cepas de *Bacillus spp.* utilizando un nivel alfa = 0.05. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el software estadístico SPSS Statistics versión 25.0 Base para Windows, con una confiabilidad del 95%.

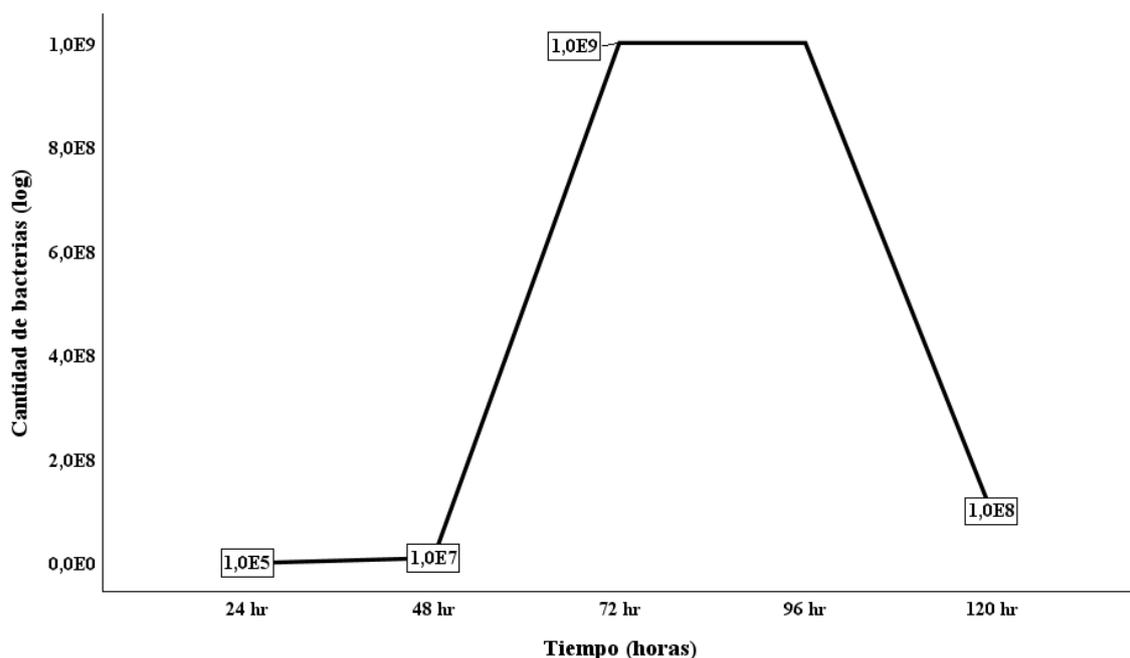
RESULTADOS

Curva de Crecimiento del Consorcio Bacteriano

El crecimiento óptimo para llegar a la concentración de $1,041 \times 10^9$ UFC/ml fue a las 72 horas. La curva de crecimiento mostrada en la Figura 4 refleja las cuatro fases características del crecimiento bacteriano descritas por Maier & Pepper (2015): fase de latencia, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de declinación. Estas fases se observan tanto en condiciones de laboratorio como en el entorno natural, dentro del marco de la dinámica de crecimiento microbiano.

En las primeras 24 horas, se identificó la fase de latencia, donde las bacterias presentan un crecimiento lento mientras se adaptan al medio, alcanzando una concentración de $4,08 \times 10^5$ UFC/ml. Entre las 24 y 48 horas, se desarrolló la fase exponencial, caracterizada por un crecimiento acelerado de la población bacteriana que llega a $5,42 \times 10^7$ UFC/ml. Posteriormente, entre las 72 y 96 horas, se presentó la fase estacionaria, donde el crecimiento bacteriano se estabiliza y la curva alcanza un equilibrio de $1,041 \times 10^9$ UFC/ml. Finalmente, entre las 96 y 120 horas, la curva muestra una leve disminución en la concentración bacteriana de $7,056 \times 10^8$, señalando el inicio de la fase de declinación.

Figura 4 Curva de crecimiento del consorcio bacteriano *La gráfica muestra la evolución del crecimiento bacteriano en función del tiempo, representando las fases características del crecimiento microbiano.*



Análisis de los Parámetros Físico-Químicos Tomados en el Sedimento

Durante la prueba, se monitorearon los valores de temperatura en el agua y pH en el sedimento, factores que participan en el proceso de biorremediación bacteriana, obteniéndose un promedio general de 27,58 °C y un pH de 7,25. Asimismo, se midió el nivel de oxígeno disuelto presente en la columna de agua de las unidades experimentales, registrándose un promedio de 6,04 mg/l. En cuanto al consumo promedio de oxígeno por las bacterias en el sedimento, se obtuvo un consumo de 1,36 mg/l en el primer tratamiento, 1,76 mg/l en el segundo tratamiento y 2,63 mg/l en el tercer tratamiento.

Efecto del Consorcio Bacteriano a Base de *Bacillus spp.* en Materia Orgánica (MO)

En el análisis de concentración de materia orgánica (MO), se indica que el incremento en la dosis del tratamiento se asocia con una reducción en el contenido de materia orgánica, lo que sugiere un efecto dependiente de la concentración aplicada (Tabla 3).

Tabla 3 Estadísticos descriptivos del porcentaje de MO en el sedimento tratado con diversas dosis del consorcio bacteriano

Materia Orgánica (%)

	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	3	6,0433	,03512	,02028	5,9561	6,1306	6,01	6,08
T1 (12µL)	3	5,6933	,02517	,01453	5,6308	5,7558	5,67	5,72
T2 (18µL)	3	4,8967	,15275	,08819	4,5172	5,2761	4,73	5,03
T3 (24µL)	3	3,8600	,18735	,10817	3,3946	4,3254	3,71	4,07
Total	12	5,1233	,88300	,25490	4,5623	5,6844	3,71	6,08

El análisis estadístico ANOVA de un factor entre grupos arrojó un p-valor de 0,001, siendo este menor que el nivel de significancia establecido ($p < 0,05$). Por consiguiente, se concluye que las medias de las concentraciones de materia orgánica (MO) mostraron diferencias significativas según las distintas dosis del consorcio bacteriano basado en *Bacillus spp.* (Tabla 4).

Tabla 4 ANOVA de un factor entre grupos para comparar las concentraciones de MO entre las diferentes dosis del consorcio bacteriano de *Bacillus spp.*

ANOVA					
Materia Orgánica (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8,456	3	2,819	186,978	<,001
Dentro de grupos	,121	8	,015		
Total	8,577	11			

Los resultados de las comparaciones múltiples utilizando Tukey HSD mostraron que el porcentaje de materia orgánica fue significativamente diferente entre todos los tratamientos evaluados (Control, Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3) en un nivel de significancia de 0,05. En todas las comparaciones, las diferentes medias entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas, lo que indica una variabilidad significativa (Tabla 5).

Tabla 5 Prueba de Tukey para comparar las concentraciones de MO entre los tratamientos

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Porcentaje de Materia Orgánica							
	(I) Tipo de Tratamiento	(J) Tipo de Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Control	Tratamiento 1	,35000*	,10025	,033	,0290	,6710
		Tratamiento 2	1,14667*	,10025	,000	,8256	1,4677
		Tratamiento 3	2,18333*	,10025	,000	1,8623	2,5044
	Tratamiento 1	Control	-,35000*	,10025	,033	-,6710	-,0290
		Tratamiento 2	,79667*	,10025	,000	,4756	1,1177
		Tratamiento 3	1,83333*	,10025	,000	1,5123	2,1544
	Tratamiento 2	Control	-1,14667*	,10025	,000	-1,4677	-,8256
		Tratamiento 1	-,79667*	,10025	,000	-1,1177	-,4756

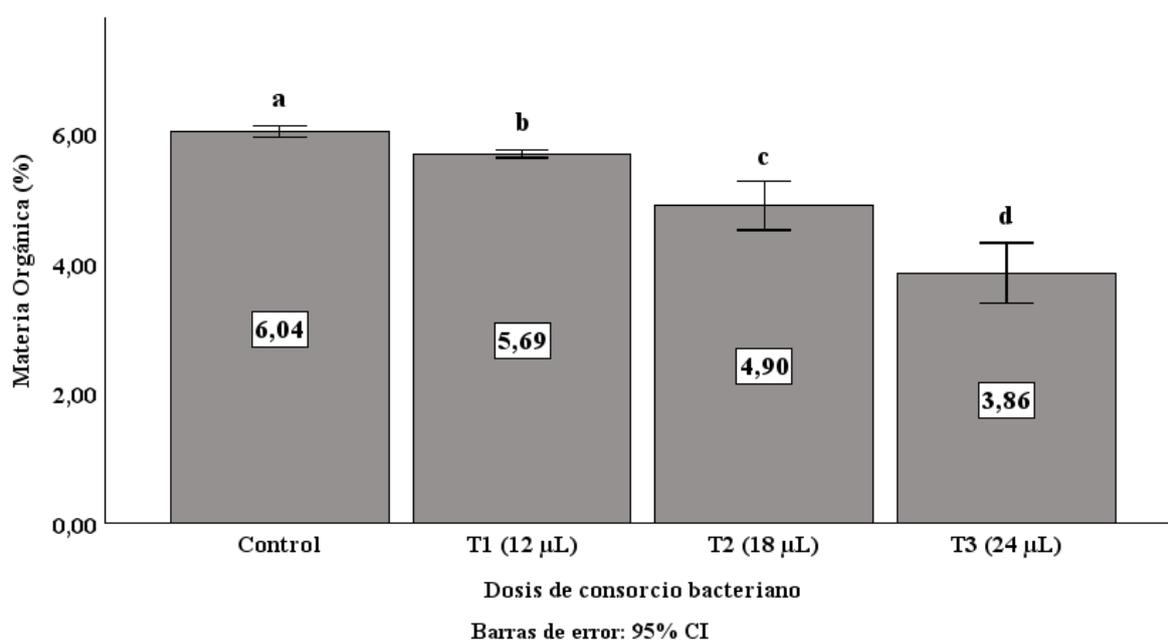
	Tratamiento 3	1,03667*	,10025	,000	,7156	1,3577
Tratamiento 3	Control	-2,18333*	,10025	,000	-2,5044	-1,8623
	Tratamiento 1	-1,83333*	,10025	,000	-2,1544	-1,5123
	Tratamiento 2	-1,03667*	,10025	,000	-1,3577	-,7156

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las dosis de consorcio bacteriano en función de la materia orgánica del sedimento para un $p\text{-valor} \leq 0,05$ (Prueba de Tukey).

El gráfico (Figura 5) ilustra la media porcentual de materia orgánica (MO) en función de las distintas dosis aplicadas en un consorcio bacteriano, con barras de error que representan el intervalo de confianza al 95%. El tratamiento control presentó, al final del ensayo, la mayor concentración de MO, con un valor promedio de 6,04% seguido del tratamiento T1 (12 μL), que mostró una leve disminución con una media de 5,69%. En el tratamiento T2 (18 μL), se observó una reducción alcanzando un promedio de 4,90%. Finalmente, el tratamiento T3 (24 μL) registró 3,86% MO, lo que evidencia el efecto más pronunciado del consorcio bacteriano en la disminución de la materia orgánica a medida que aumenta la concentración de bacterias. Esta disminución del 2,54% de MO en los análisis representa el 63% de reducción de MO.

Figura 5 Efecto de diferentes dosis del consorcio bacteriano sobre el contenido de MO en muestras de sedimento de piscinas camaroneras en un modelo in vitro *Distintas dosis del consorcio afectan la concentración de materia orgánica en los sedimentos de piscinas camaroneras.*



Análisis de Nitrógeno Total y Fósforo del Sedimento

El análisis de inicial del sedimento (tabla 6) reveló un contenido de nitrógeno total del 0.98 % y 75.00 ppm de fósforo, lo que confirma la presencia de estos nutrientes en el sedimento de la piscina camaronera previo al inicio del experimento. La acumulación de nitrógeno y fósforo en los estanques de acuicultura puede atribuirse al uso de alimentos comerciales, desechos de los organismos y a la aplicación de fertilización con abonos orgánicos, tal como lo señala Bai *et al.* (2023).

Tabla 6 Análisis inicial de nitrógeno total y fósforo de la muestra de sedimento

Resultados e interpretación de: Análisis de suelo de camaronera			
Cod. Muestra	Nombre de muestra	N Total	P
		%	p.p.m.
52159 PISCINA #2		0.98	75.00

El análisis de nitrógeno total y fósforo en las muestras de sedimento reveló resultados significativos (tabla 7). De la muestra tomada de las unidades de control (muestra #1), el contenido de nitrógeno total disminuyó en un 0,09%, alcanzando un valor final característico. El fósforo se redujo significativamente en 45.00 ppm, con un valor final de 30.00 ppm, debido a que durante el experimento no se aplicaron nutrientes y, por ende, las bacterias encontradas en el medio realizan una función de consumir. Las muestras tratadas con 12 μ L (muestra #2) y 18 μ L (muestra #3), ambos tratamientos mostraron una reducción moderada del 0,04% en nitrógeno total, manteniéndose en 0,94%. El fósforo disminuyó en 28.00 y 18.00 ppm, respectivamente. La muestra tratada con 24 μ L (muestra #4), presentó la mayor reducción de nitrógeno total, con un 0,10%, alcanzando 0,88%, y una disminución de 21.00 ppm de fósforo.

Tabla 7 Análisis final de nitrógeno total y fósforo de las muestras de sedimento por tratamiento

Resultados e interpretación de: Análisis de suelo de camaronera			
Cod. Muestra	Nombre de muestra	N Total	P
		%	p.p.m.
52276	Muestra #1	0.89	30.00
52277	Muestra #2	0.94	47.00
52278	Muestra #3	0.94	57.00
52279	Muestra #4	0.88	54.00

Los resultados evidencian que el contenido de nitrógeno total se mantuvo relativamente estable en los tratamientos con aplicaciones de 12, 18 y 24 μL del mix bacteriano, debido a la adición continua de nutrientes durante el experimento. En contraste, el fósforo mostró una disminución significativa en el tratamiento con 12 μL , en comparación con los tratamientos de mayor dosificación (18 y 24 μL). Este comportamiento podría deberse a una menor población de bacterias del género *Bacillus* en este tratamiento, lo que permitió el crecimiento de otras bacterias capaces de consumir mayores cantidades de fósforo, desplazando a las bacterias de *Bacillus spp.*

DISCUSIONES

Curva de Crecimiento

El crecimiento óptimo del consorcio bacteriano alcanzó una concentración de $1,041 \times 10^9$ UFC/ml a las 72 horas. Los resultados obtenidos en este experimento difieren a los obtenidos por Viteri (2020), quien observó un comportamiento diferente en el crecimiento de *Bacillus spp.* mediante conteo en la cámara de Neubauer. Este investigador reportó fases de crecimiento más rápidas de *Bacillus spp.* en las primeras 4 horas. Esto puede explicarse por factores como la temperatura, aireación y nutrientes, mientras que Liñán (2019) demostró un mayor crecimiento de los *Bacillus spp.* en medios ricos, como el medio de cultivo Agar Soya Triptocaseína (TSA) y Man, Rogosa y Sharpe (MRS), donde quedó demostrado que las cepas de *Bacillus spp.* crecieron más en el TSA debido a la composición de proteína vegetal y nutrientes esenciales, en comparación con el trabajo experimental que utilizó peptona de soya, ya que, por sus nutrientes esenciales, se logró un crecimiento bacteriano óptimo para el experimento. Esto coincide con lo señalado por Zhurbenko *et al.* (2006), quienes destacaron que la peptona de soya proporciona una amplia gama de nutrientes como proteínas, carbohidratos y vitaminas, lo que constituye una excelente base nutritiva para el cultivo de los microorganismos. Por otro lado, Castañeda & Consuelo, (2016) utilizaron un caldo de medio mínimo de Sales (MMS) ajustado a un pH de 6 para evaluar la curva de crecimiento de diferentes especies de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), alcanzando una fase exponencial a las primeras 5 horas. En el ensayo realizado, se comprobó que estas especies mostraron un crecimiento más lento. Además, el cultivo se ajustó a un pH de 7,5, considerado dentro del rango óptimo de crecimiento para el género *Bacillus*, lo que podría explicar las diferencias observadas en el comportamiento del crecimiento bacteriano. Por su parte, Viteri (2020) menciona que la velocidad de crecimiento de las bacterias puede verse afectado por muchos factores y condiciones, como la cantidad de oxígeno ingresado, así como la temperatura a la que se encuentra y disponibilidad de nutrientes.

Estadísticos descriptivos del porcentaje de MO en el sedimento tratado con diversas dosis del consorcio bacteriano.

Los resultados de las comparaciones múltiples mostraron que el porcentaje de materia orgánica fue significativamente diferente entre todos los tratamientos evaluados (Control, Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3). Estos hallazgos concuerdan con Lopes (2021), quien destaca que el género *Bacillus* acelera la descomposición de la materia orgánica en sedimentos de sistemas acuícolas. Además, James *et al.* (2021) refuerzan que la capacidad de formar esporas, la producción de enzimas hidrolíticas y la alta adaptabilidad posicionan a *Bacillus* como un agente clave en la biorremediación. Nayak, (2021) complementa indicando que especies como *B. cereus*, *B. polyfermenticus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* poseen esta capacidad destacada para formar esporas y participar en procesos de biodegradación.

ANOVA de un factor entre grupos para comparar las concentraciones de MO entre las diferentes dosis del consorcio bacteriano de *Bacillus spp.*

El análisis estadístico ANOVA de un factor indicó diferencias significativas en las medias de concentraciones de materia orgánica (MO) entre las distintas dosis del consorcio bacteriano basado en *Bacillus spp.* (p -valor = 0,001; Tabla 4). Según Hernández (2019), *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* son efectivos en la biodegradación, alcanzando un 70% de reducción de MO en un microcosmos enriquecido (90 días, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, flujo de 3L/h). En este experimento con una duración de 20 días, difiere del anterior, ya que solo se logró una reducción del 3,86 % en el T3 lo que representa el 63% menos de MO bajo condiciones específicas, con fuentes de nitrógeno y fósforo. Esto puede deberse a que no se trabajó con flujo continuo de agua, que también ayuda a reducir la cantidad de nutrientes, aun así, los resultados son prometedores, ya que se logró disminuir la cantidad de materia orgánica acumulada en el sedimento.

Efecto de Diferentes Dosis del Consorcio Bacteriano Sobre el Contenido de MO en Muestras de Sedimento de Piscina Camaronera en un Modelo in Vitro

Según los resultados, el tratamiento control presentó la mayor concentración de materia orgánica (MO) con un promedio de 6,04 %, mientras que las intervenciones con el consorcio bacteriano mostraron reducciones graduales: T1 (12 μ L) con un 5,69 %, T2 (18 μ L) con 4,90 %, y T3 (24 μ L) con un 3,86 %, evidenciando una mayor eficacia a mayor concentración bacteriana. Estos resultados concuerdan con Oliveira (2021), quien demostró que la aplicación de bacterias del género *Bacillus* (producto BioPlus® PS) en sedimentos de policultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) logró una reducción significativa de MO y mejoró la composición microbiana del sustrato. Bazurto (2020) también reportó que la inclusión de productos con *Bacillus spp.*, en proporciones del 1,5 % y 2,5 %, disminuyó la MO en estanques y mejoró el factor de conversión, logrando una reducción del 3 % de MO. En comparación, el presente experimento alcanzó una disminución del 2,54 %, corroborando la capacidad de biorremediación de *Bacillus* en condiciones controladas.

Análisis de Nitrógeno Total y Fósforo del Sedimento

Los resultados muestran estabilidad en el contenido de nitrógeno total en los tratamientos con 12, 18 y 24 μ L debido a la adición constante de nutrientes. En contraste, el fósforo disminuyó significativamente en el tratamiento con 12 μ L, lo cual podría explicarse por la menor población de *Bacillus spp.* en esta dosis, favoreciendo el crecimiento de otras bacterias que consumen mayores cantidades de fósforo. Según Lara *et al.* (2011), aproximadamente el 10 % de la microbiota del suelo incluye géneros como *Bacillus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*, capaces de solubilizar fósforo, lo que sugiere que la reducción de *Bacillus* en el tratamiento con menor dosis pudo haber limitado esta función. Este comportamiento es similar al observado por Bhambri *et al.* (2021), quienes reportaron una remoción superior al 99 % de fósforo y nitrógeno utilizando *Bacillus spp.* BK1 en efluentes industriales tratados. Estos hallazgos resaltan la eficiencia de *Bacillus* en la biorremediación, pero también evidencian que su efectividad puede depender de su densidad poblacional en el sistema.

CONCLUSIONES

- Se logró una masificación exitosa de las cepas de *Bacillus spp.* en condiciones controladas, alcanzando una curva de crecimiento bacteriano con concentraciones óptimas durante la fase exponencial. Se evidenció una alta adaptabilidad y proliferación del consorcio bacteriano en el medio preparado, lo que permitió obtener las concentraciones deseadas para los tratamientos aplicados.
- El consorcio bacteriano demostró su efectividad en la biodegradación de la materia orgánica acumulada en los sedimentos acuícolas. Se observó una disminución significativa en los niveles de materia orgánica al comparar los tratamientos con diferentes dosis del consorcio (12 μL , 18 μL y 24 μL) frente al grupo control, logrando una reducción del 63%.
- La dosis de 24 μL del consorcio bacteriano fue la más eficiente en la reducción de materia orgánica en los sedimentos acuícolas, logrando una disminución promedio del 3,86 %, en comparación con los valores iniciales y con los otros tratamientos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que avalan la efectividad del género *Bacillus* en procesos de biorremediación.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que futuros experimentos evalúen la aplicación de este consorcio bacteriano para la degradación de materia orgánica en sedimentos acuícolas con salinidad alta, con el fin para comprobar el potencial de las bacterias del género *Bacillus*.
- Para favorecer un rápido crecimiento bacteriano, se recomienda proporcionar una aireación constante al medio de cultivo.
- Se sugiere realizar ajustes periódicos en la concentración de nitrógeno y fósforo en las unidades experimentales para garantizar que las bacterias del género *Bacillus* tengan un suministro adecuado de nutrientes para su proliferación, sin generar excesos que afecten la calidad del agua o sobrecarguen el sistema.
- Se debe considerar incorporar ensayos con estas cepas bacterianas por un período más prolongado y en presencia de animales, con el objetivo de reflejar mejor un cultivo acuícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard, S., Costa, M., Bulseco, A., Helfer, V., Wilkins, L., Hassenrück, C., Zengler, K., Zimmer, M., Erazo, N., Mazza, J., Duke, N., Melo, V., Vanwonderghem, I., Junca, H., Makonde, H., Jiménez, D., Tavares, T., Fusi, M., Daffonchio, D., ... Bowman, J. (2020). Introducing the Mangrove Microbiome Initiative: Identifying Microbial Research Priorities and Approaches To Better Understand, Protect, and Rehabilitate Mangrove Ecosystems. *MSystems*, 5(5). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/msystems.00658-20>
- Alori, E., Gabasawa, A., Elenwo, C., & Agbeyegbe, O. (2022). Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. *Frontiers in Soil Science*, 2, 937186. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/FSOIL.2022.937186/BIBTEX>
- Arias, F., & Zambrano, A. (2022). *Efecto de la resuspensión de sedimentos en la calidad de agua en estanques de cultivo de Litopenaeus Vannamei. (Tesis de grado)* [Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/21045>
- Arias, L. (2014). *Estandarización de una metodología para la medición de fosfatos (PO₄³⁻) por el método fotométrico en muestras. (Tesis de grado)*. [UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA FACULTAD DE TECNOLOGÍA]. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/cd43b3df-a4ec-4c27-b8ff-2780bc8a9085/content>
- Bai, D., Li, X., Liu, Z., Wan, L., Song, C., Zhou, Y., & Cao, X. (2023). Nitrogen and phosphorus turnover and coupling in ponds with different aquaculture species. *Aquaculture*, 563, 738997. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738997>
- Barman, D. (2020). Bioremediation of Waste Waters and Application in Aquaculture - A Mini Review. *Research Biotica*, 2(1), 20–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.54083/ResBio.2.1.2020.20-25>
- Barrezueta-Unda, S., Cervantes-Alava, A., Ullauri-Espinoza, M., Barrera-Leon, J., & Condoy-Gorotiza, A. (2020). Evaluación del método de ignición para determinar

materia orgánica en suelos de la provincia El Oro-Ecuador. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 19(2), 25–36. <https://doi.org/10.14409/FA.V19I2.9747>

Bazurto, J. (2020). *Prevención de la proliferación de patógenos mediante la acción de los microorganismos en el suelo de piscinas camaroneras. (Tesis de grado)*. [Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/16107>

Bhambri, A., Kumar, S., & Singh, R. (2021). In-situ remediation of nitrogen and phosphorus of beverage industry by potential strains *Bacillus* sp. (BK1) and *Aspergillus* sp. (BK2). *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-91539-y>

Burbano-Gallardo, E., Nivia-Duque, G., Imues-Figueroa, M., Gonzalez-Legarda, E., Delgado-Gómez, M., & Pantoja-Díaz, J. (2021). Efecto de cultivos piscícolas en los sedimentos y la proliferación de comunidades bacterianas nitrificantes en el lago Guamuez, Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2). https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1581

Cámara Nacional de Acuicultura. (2024). Acuicultura la voz oficial del sector. *Revista Acuicultura - Cámara Nacional de Acuicultura*. <https://www.cna-ecuador.com/revista-acuicultura/>

Caramuti, V., Ruiz, M., Gallace, M., & Dalmasso, L. (2020). Microscopía para laboratorios cerveceros. In *Microbiología Cervecera: Manual teórico práctico*. Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Agronomía. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/162571>

Castañeda, E., & Consuelo, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53–62. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702016000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Castro, J. L. (2021). *Análisis comparativo de dos bacterias (Pro 4000x y Hgs7) utilizadas en procesos de biorremediación en las piscinas del cultivo de *Litopenaeus vannamei* de la empresa acuícola San Andrés (El Oro) (Tesis de*

grado). [Universidad Católica de Santiago de Guayaquil].
<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/17185/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-180.pdf>

Chaverra-Garcés, S. (2022, June 16). Acumulación de sólidos, un aspecto crítico en los sistemas acuícolas intensivos: alternativas para una gestión sostenible. *Orinoquia*, 26(1), 53–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.22579/20112629.731>

Chhetri, B., Silwal, P., Jyapu, P., Maharjan, Y., Lamsal, T., & Basnet, A. (2022). Biodegradation of Organic Waste Using Bacillus Species Isolated From Soil. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 10(2), 104–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.3126/IJASBT.V10I2.44303>

Colette, M., Guentas, L., Patrona, L. D., Ansquer, D., & Callac, N. (2023). Dynamic of active microbial diversity in rhizosphere sediments of halophytes used for bioremediation of earthen shrimp ponds. *Environmental Microbiome*, 18(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40793-023-00512-x>

Correa, H., Berrué, F., Haltli, B., Duque, C., & Kerr, R. (2023). Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del Phylum firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la isla de providencia (caribe sur-occidental). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 337–348. [https://doi.org/https://doi.org/10.18257/raccefyn.35\(136\).2011.2516](https://doi.org/https://doi.org/10.18257/raccefyn.35(136).2011.2516)

Drózd, D., Malińska, K., Mazurkiewicz, J., Kacprzak, M., Mrowiec, M., Szczypiór, A., Postawa, P., & Stachowiak, T. (2020). Fish pond sediment from aquaculture production – current practices and the potential for nutrient recovery: a Review. *International Agrophysics*, 34(1), 33–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.31545/intagr/116394>

Galicia-Jiménez, M., Sandoval-Castro, C., Rojas-Herrera, R., & Magaña-Sevilla, H. (2011). Quimiotaxis bacteriana y flavonoides: perspectivas para el uso de probióticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3), 891–900. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Godoi, L., Costa, R., De Bello, R., Diniz, C., Sabatini, C., & Tallarico, M. (2021). Métodos analíticos aplicados ao monitoramento de processos biológicos de tratamento de águas residuárias. *Portal de Livros Abertos Da USP*. <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/9786586954067>
- Gonzabay, Á., Vite, H., Garzón, V., & Quizhpe, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Dialnet*, 6(9), 1040–1058. <https://doi.org/https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3093>
- Guerrero, V. (2023). *Uso de bacterias biorremediadoras para reducir la materia orgánica en los cultivos de camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. (Tesis de grado) [Universidad Técnica de Machala]. https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/22688/1/Trabajo_Titulacion_2917.pdf
- Hasibuan, S., Syafriadiman, S., Aryani, N., Fadhli, M., & Hasibuan, M. (2023). The age and quality of pond bottom soil affect water quality and production of *Pangasius hypophthalmus* in the tropical environment. *Aquaculture and Fisheries*, 8(3), 296–304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.11.006>
- Hernández, Y. (2019). *Uso de Bacillus coagulans para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz*. (Tesis de grado). [Universidad Veracruzana]. <https://www.uv.mx/pozarica/egia/files/2019/09/GIAM-2018-2019-Yolanda-Hernandez.pdf>
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F., Afriyie, G., Abarike, E., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. (2020, November 1). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>
- Husain, R., Vikram, N., Yadav, G., Kumar, D., Pandey, S., Patel, M., Khan, N., & Hussain, T. (2022). Microbial bioremediation of heavy metals by Marine bacteria. *Development in Wastewater Treatment Research and Processes: Microbial Degradation of Xenobiotics through Bacterial and Fungal Approach*, 177–203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85839-7.00014-1>

- Izquierdo, J., & Arévalo, J. (2021). Determinación del carbono orgánico por el método químico y por calcinación. *Ingeniería y Región*, 26, 20–28. <https://doi.org/10.25054/22161325.2527>
- James, G., Das, B., Jose, S., & Rejish, K. (2021). Bacillus as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International* 2021 29:1, 29(1), 323–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10499-020-00630-0>
- Jimenez, A., & Quispecahuana, M. (2024). Enriquecimiento de consorcios microbianos de muestras de suelo para la bioconversión de queratina. *XIII Jornada Científica de Estudiantes de Ingeniería Ambiental: 2024 - Campus Lima*. <https://indico.upeu.edu.pe/event/2/contributions/180/>
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., García-Hernández, J. L., Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of Botrytis cinerea by Bacillus amyloliquefaciens isolates. *Redalyc*, 11(9), 2210–2217. <https://doi.org/https://doi.org/10.5897/ajb11.645>
- Kim, J., Kim, Y., Park, S., Kim, T., Kim, B., Kang, D., & Rho, T. (2021). Impact of aquaculture on distribution of dissolved organic matter in coastal Jeju Island, Korea, based on absorption and fluorescence spectroscopy. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(1), 553–563. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-021-15553-3>
- Lara, C., Avila, L., & Peña, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(2), 114–120. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=380878963017>
- Liñán, M. (2019). *Evaluación de un consorcio de Bacillus sp. sobre la fermentación de salvado de arroz y su efecto en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei. (Tesis de Posgrado)* [Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste]. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3006>

- Lopes, G. (2021). *Estratégias de biorremediação de sedimentos em viveiros de piscicultura com bactérias do gênero Bacillus: estudo em escala laboratorial*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS.
- López-López, J., Córdova-Pacheco, A., Morales-Carrasco, L., & Barona-Oñate, R. (2023). El consumo mundial de camarón: Una perspectiva de la producción ecuatoriana y la demanda europea. *Revista Económica*, 11(1), 74–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.54753/rve.v11i1.1621>
- Maier, R., & Pepper, I. (2015). Bacterial Growth. *Environmental Microbiology: Third Edition*, 37–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Mendes, H. (2021). *Redução de matéria orgânica com aplicação de Bacillus subtilis e B. licheniformis em sedimentos provenientes de viveiro de policultivo de Litopenaeus vannamei com Oreochromis niloticus (Tesis de maestría)*. [Universidad Federal de Santa Catarina]. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/230891>
- Mishra, M., Singh, S., & Kumar, A. (2021). Environmental factors affecting the bioremediation potential of microbes. *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*, 47–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00005-5>
- Navarrete, J., Noles, P., Delgado, C., Hernández, N., & Guerrero-Ríos, R. (2022, March 7). Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón por medio de consorcios microbianos autóctonos y microalgas nativas en Manabí, Ecuador. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 4(1), 53–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.33936/at.v4i1.4635>
- Nayak, S. (2021). Multifaceted applications of probiotic Bacillus species in aquaculture with special reference to Bacillus subtilis. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 862–906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Oliveira, H. (2021). *Redução de matéria orgânica com aplicação de Bacillus subtilis e B. licheniformis em sedimentos provenientes de viveiro de policultivo de*

Litopenaeus vannamei com *Oreochromis niloticus*. (Tesis de maestría). [Universidade Federal de Santa Catarina]. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/230891>

Pal, A., Singh, J., Soni, R., Tripathi, P., Kamle, M., Tripathi, V., & Kumar, P. (2020, January 1). The role of microorganism in bioremediation for sustainable environment management. *Bioremediation of Pollutants: From Genetic Engineering to Genome Engineering*, 227–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00010-7>

Pedraza, L., López, C., & Uribe-Velez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

Pindo, B. (2022). *Eficacia de la aplicación de un consorcio bacteriano elaborado a base de Bacillus Subtilis y Bacillus Licheniformis para la reducción de materia orgánica en sedimentos de piscinas camaroneras. (Tesis de grado)* [Repositorio Digital de la UTMACH]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/21039>

Prasad, S., Balakrishna, Ch., Yeshdas, B., Ravinder, B., Mahesh, R., Bhanu, Ch., Kummari, S., & Rajender, B. (2021). A review on resilience of microbes in aquatic environment. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(2), 1403–1410. <https://doi.org/https://doi.org/10.22271/j.ento.2021.v9.i2q.8659>

Quimí, F. (2024). “*Evaluación de Dunaliella spp. enriquecida con carotenos como alimento para larvas de camarón Litopenaeus vannamei de Nauplio V a post-larva 1*”. (Tesis de grado). [Universidad Estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/11703/1/UPSE-TBI-2024-0045.pdf>

Rodríguez, G., Gómez, A., Anaya, J., Velásquez, C., & Miniet, A. (2021). Elaboración de medios de cultivo alternativos y viables para el crecimiento microbiano del *Bacillus Subtilis*: Development of alternative and viable culture media for the microbial growth of *Bacillus Subtilis*. *La U Investiga*, 8(1), 86–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.53358/lauinvestiga.v8i1.472>

- Sandoval, M., Dorner, J., Seguel, O., & Cuevas, J. (2012). *Métodos de análisis físicos del suelo*. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/59208>
- Shivalkar, S., Vishal, S., Amaresh, S., Sintu, S., & Pavan, G. (2021). Bioremediation: a potential ecological tool for waste management. *Bioremediation for Environmental Sustainability: Approaches to Tackle Pollution for Cleaner and Greener Society*, 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820318-7.00001-0>
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S., Kumar, V., Lymbery, A., Roy, S., & Ringø, E. (2019). Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(3), 331–379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- Tucker, C., & Hargreaves, J. (2009). Environmental Best Management Practices for Aquaculture. *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*, 1–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780813818672>
- Villarreal-Delgado, M., Villa-Rodríguez, E., Cira-Chávez, L., Estrada-Alvarado, M., Parra-Cota, F., & Santos-Villalobos, S. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Scielo*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Viteri, C. (2020). *Curvas de crecimiento de Bacillus subtilis a través de las técnicas para el crecimiento microbiano y para la curva de consumo de sustrato. (Tesis de grado)*. [Universidad de las Américas]. https://www.udocz.com/apuntes/712795/crecimiento-b-subtilis#goog_rewarded
- Zhou, S., Zhou, H., Xia, S., Ying, J., Ke, X., Zou, S., Xue, Y., & Zheng, Y. (2021). Efficient bio-degradation of food waste through improving the microbial community compositions by newly isolated Bacillus strains. *Bioresource Technology*, 321, 124451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.124451>
- Zhurbenko, R., Rodríguez, C., Días, M., Durán, A., López, O., & Viera, D. (2006). Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *REV*

CUBANA MED TROP, 58(2), 109–127.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000200003#:~:text=En%20general%2C%20la%20peptona%20de,cultivo%20de%20los%20microorganismos%20fastidiosos.

ANEXOS

Anexo 1: Método para Contabilizar las Bacterias por el Método de la Cámara de Neubauer.

Para el conteo de bacterias en la cámara de Neubauer se siguió la metodología de Caramuti *et al.* (2020).

1. Preparación de la cámara de Neubauer: Limpiar la cámara de Neubauer y el cubre objetos con alcohol y secar con un papel libre de pelusas. Luego, colocar el cubreobjetos.
2. Carga de la muestra: Usar una micropipeta electrónica para tomar 10 µL de la dilución seriada. Colocar la muestra en la ranura de la cámara y esperar 1 minuto para que las bacterias se distribuyan homogéneamente.
3. Observación en el microscopio: Colocar la cámara en el microscopio y enfocar con el objetivo de 40X. Identificar la cuadrícula del cuadro central (25 cuadrados).
4. Conteo de bacterias: Contar las bacterias en al menos cinco cuadros grandes.
5. Cálculo de la concentración: La fórmula general para determinar la concentración de bacteria es:

$$CC = CTCC * 10.000 * FD$$

Donde:

CC (cél/mL): Concentración de células de bacterias de la muestra.

CTCC: Células totales contenidas en el cuadro grande central.

FD: Factor de dilución.

Anexo 2: Método para Determinar el Nitrógeno total de las Muestras de Sedimento

El nitrógeno total se determinó siguiendo la metodología de Jiménez & Quispecahuana (2024).

1. Digestión: Convertir el nitrógeno orgánica en amonio (NH_4) mediante oxidación en medio ácido.
 - Preparación de la muestra: Pesar 1 g de muestra homogénea (tamizada a 2 mm) y colocar en un tubo de digestión Kjeldahl.
 - Adición de reactivos: Agregar 3 g de K_2SO_4 (sulfato de potasio) y 0,5 g de CuSO_4 (sulfato de cobre) en cada tubo. Luego añadir 25 ml de H_2SO_4 (ácido sulfúrico concentrado).
 - Digestión térmica: Colocar los tubos en el digestor Kjeldahl y calentar a 420 °C durante 2 horas, hasta que la solución se torne verde azulado, indicando la oxidación completa del material orgánico.
 - Enfriamiento: Dejar enfriar los tubos antes de proceder a la destilación.
2. Destilación: Liberar el amonio en forma de gas (NH_3) y capturarlo en una solución de ácido bórico.
 - Preparación de la captura: En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, añadir 50 mL de H_3BO_3 al 4% (ácido bórico).
 - Adición de reactivos a los tubos digeridos: agregar 50 mL de agua destilada y 80 mL de NaOH 10N (hidróxido de sodio) para liberar el NH_3 en forma gaseosa.
 - Destilación del amoníaco: Conectar los tubos al sistema de destilación Kjeldahl y destilar hasta que todo el amoníaco haya sido arrastrado por el vapor y capturado en la solución de ácido bórico.
3. Titulación: Determinar la cantidad de nitrógeno mediante una titulación ácido-base.
 - Indicador: Agregar unas gotas de una solución alcohólica de rojo de metilo y azul de metileno en el matraz e recolección.
 - Titulación: Titrar con H_2SO_4 10N hasta que la solución cambie de color, utilizar el pH de la muestra en blanco como referencia.

4. Cálculo del nitrógeno total: Para el cálculo de concentración de nitrógeno total se usó la siguiente ecuación, recomendada por (Godoi *et al.*, 2021).

$$N = \frac{V_1}{V_m} \times M_{H_2SO_4} \times 2 \times 14.000$$

Donde:

N= representa la concentración de nitrógeno de la muestra, en mg N-NH₄/L o N-NTK/L

V₁= volumen de la solución de ácido utilizado para titular la muestra (mL)

V_m= volumen original de la muestra antes de la digestión (mL)

M_{H₂SO₄}= molaridad de solución de ácido sulfúrico utilizado en la titulación (mol/L)

2= número de hidrógenos ionizados en la molécula de (H₂SO₄)

14.000= equivalente de nitrógeno contenido en (NH₄)

Anexo 3: Método para Determinar el Fósforo de las Muestras de Sedimento

Para la determinación del fósforo, se utilizó el método colorimétrico, siguiendo la metodología de Arias (2014) y utilizando espectrofotometría UV-Visible.

1. Preparación de la solución estándar de fósforo: Elaborar una solución madre de fósforo para la calibración del método.
 - Secado del reactivo: Pesar fosfato de dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4), secarlo en un horno a 105 °C durante 1 hora y transferirlo a un desecador hasta que alcance temperatura ambiente.
 - Elaboración de la solución estándar: Pesar exactamente 0.0550 g de KH_2PO_4 y transferirlo a un matraz aforado de 250 mL. Completar con agua destilada hasta el aforo para obtener una concentración de 50 mg/L de fósforo (P).
2. Preparación de las soluciones patrón: Obtener diferentes concentraciones de fósforo para la curva de calibración.
 - A partir de la solución estándar de 50 mg/L, preparar diluciones para obtener soluciones patrón con concentraciones de: 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, a partir de estas soluciones patrón, elaborar patrones secundarios con concentraciones entre 0.1 y 3 mg/L, definiendo así el rango de trabajo.
3. Construcción de la curva de calibración: Establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de fósforo.
 - Medir la absorbancia de las soluciones patrón en un espectrofotómetro UV-Visible a la longitud de onda adecuada (generalmente 880 nm para el método del ácido ascórbico), graficar la curva de calibración con los datos obtenidos y calcular los parámetros estadísticos para la estandarización el método.
4. Análisis de las muestras reales:
 - Tomar la muestra de suelo, medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Visible y comparar los valores obtenidos con la curva de calibración para calcular la concentración de fósforo presente en las muestras.

Anexo 4: Método de Walkley & Black para Determinar la Materia Orgánica

Para la determinación de materia orgánica, se utilizó la metodología descrita por Barrezueta-Unda *et al.* (2020).

1. Pesar 1 g de suelo seco y tamizado.
2. Colocar la muestra pesada en un balón aforado de 100 mL.
3. Añadir 10 mL de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).
4. Añadir 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 al 96%).
5. Mezclar la solución durante 30 segundos y dejar reposar durante 15 minutos.
6. Aforar el balón con agua destilada, reestablecer exactamente el nivel del aforo cuando se haya enfriado la solución.
7. Extraer 20 mL de solución y colocarlo en un Erlenmeyer de 250 mL.
8. Agregar en el Erlenmeyer 3 ml de ácido fosfórico al 85% (H_3PO_4) y seis gotas de difenilamina ($(C_6H_5)_2NH$).
9. Titular con sulfato ferroso amoniacal 0,2 N (Fe_2SO_4) hasta viraje a color verde claro.
10. Calcular el porcentaje (%) de MO: La materia orgánica del suelo (MOS) se calculó multiplicando el resultado por el factor de conversión (FQ) 1.724.

$$\% CO = (\text{ml dicromato} - \text{ml sulfato}) \times 0.4$$

11. Para la determinación del porcentaje de materia orgánica, se utilizó la fórmula recomendada por (Izquierdo & Arévalo, 2021):

$$\%MOS = 1,724 \times \% CO$$

Anexo 5: Método para Determinar el pH del Sedimento Acuicola

Para la determinación del pH del suelo se siguió las indicaciones de Sandoval *et al.* (2012).

1. Preparación de la mezcla.
 - Pesar 10 g de suelo seco, tamizado a 2mm, colocar la muestra en un vaso de plástico, añadir 25 mL de agua destilada al vaso, manteniendo una proporción de 1:2.5 (suelo: agua).
2. Agitación de la mezcla.
 - Agitar la mezcla durante 3 minutos para asegurar que el suelo se mezcle bien con el agua.
 - Dejar reposar durante 30 minutos para permitir que se estabilice.
3. Medición del pH
 - Agitar nuevamente la mezcla antes de proceder con la medición
 - Utilizar un potenciómetro para medir el pH de la suspensión.

Anexo 6. Siembra en medio de cultivo líquido a partir de las cepas en placa.



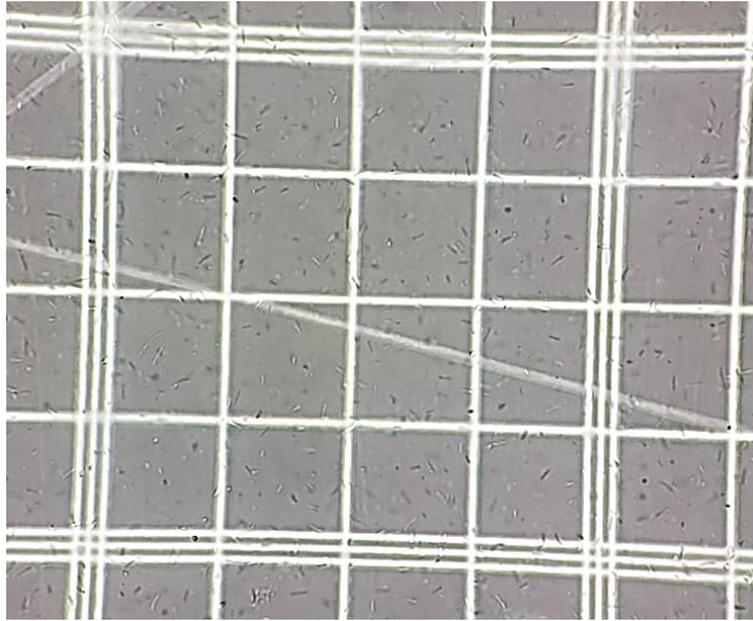
Anexo 7. Dilución seriada del cultivo líquido.



Anexo 8. Conteo de *Bacillus spp*, por medio de la cámara de Neubauer.



Anexo 9. Visualización de *Bacillus spp.*



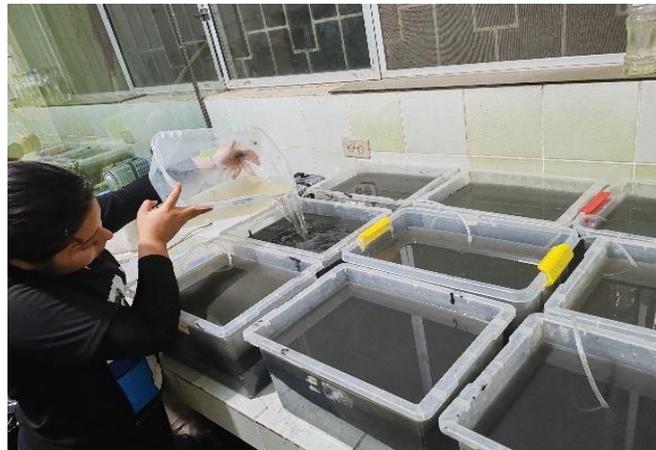
Anexo10. Recolección del sedimento acuícola.



Anexo 11. Homogenización de las muestras de sedimento.



Anexo 12. Preparación de las unidades experimentales.



Anexo 13. Inicio del trabajo experimental.



Anexo 14. Pesaje de nutrientes para los tratamientos.



Anexo 15. Aplicación de tratamientos.



Anexo 16. Recolección de muestras para los respectivos análisis.



Anexo 17. Tamizado de muestras de sedimento.



Anexo 18. Toma de pH de las muestras de sedimento.



Anexo 19. Proceso de digestión del sedimento mediante ácido sulfúrico más dicromato de potasio.



Anexo 20. Proceso de titulación mediante solución de sulfato ferroso amoniacal.



Anexo 21. Análisis inicial de Nitrógeno Total y Fósforo.



NEMALAB S.A.

En convenio con el MAG - PRODE y AGEAP

OFICINAS CENTRALES

KM 1 1/2 (ANTIGUA VIA FERREA) S/N Y GRUPO BOLIVAR, EL CAMBIO - MACHALA, EL ORO Tel. Fax: (593)

29/08/2024

Pág: 1 / 1

Cliente: ROMERO R. ARIANA/GUALAN S.JOHANNA

Documento No: 00062673

Remitente: ROMERO Y GUALAN

Fecha de Muestreo: 13/08/2024

Propiedad: CAMARONERA N/D

Fecha de Ingreso: 13/08/2024

Localización:

HUAQUILLAS

EL ORO

Fecha de Salida: 29/08/2024

Sitio

Parroquia

Cantón

Provincia

Resultados e Interpretación de: ANALISIS DE SUELO CAMARONERA + TEXTURA

Cód. Muestra	Nombre de Muestra	pH	M.O.	N Total	C	C/N	NH4	P	S	NO2	NO3	Fe Total	P Total	C.I.C.
			%	%	Relac.	p.p.m.			%	meq/100g				
52159	PISCINA# 2	0.0	0.00	0.98	0.00	0.00	0.00	75.00	0.0	--	--	--	--	0.00

Interpretación:	Requerimientos de Cal	Interpretación C/N:
pH = 7.5 - 8.5	pH	Excesiva liberación de Nitrógeno < 10
M.O. = 2.5 - 5.0 %	Cal Kg/Ha	Normal liberación de Nitrógeno 10-12
N Total = 0.1 - 0.2 %	Menos de 5	Escasa liberación de Nitrógeno 12-15
Fósforo = 18.0 - 25.0	5 - 6	Muy escasa liberación de Nitrógeno >15
	6 - 6.5	C/N
	6.5 - 7	8-12

Estos resultados pueden ser sujetos de comparación, siempre y cuando se utilice la misma metodología utilizada en este Laboratorio.
Esta Hoja de Resultados es válida sólo con firma y sello en original.

BIOQ. MARTHA MOREIRA L.
Jefe de Laboratorio

Gerente Técnico

ING. NARCIZA BUSTADO
Secretaria

"Análisis que hacen la diferencia"
NEMALAB
Laboratorio de análisis agrícolas

F01013R

Anexo 22. Análisis final de Nitrógeno Total y Fósforo.



NEMALAB S.A.

En convenio con el MAG - PRODE y AGEAP

OFICINAS CENTRALES

KM 1 1/2 (ANTIGUA VIA FERREA) S/N Y GRUPO BOLIVAR, EL CAMBIO - MACHALA, EL ORO Tel.

15/10/2024

Pág: 1 / 1

Cliente: ROMERO R. ARIANA/GUALAN S.JOHANNA

Remitente: ROMERO ARIANA-GUALAN

Propiedad: CAMARONERA SAN PATRICIO

Localización:

Sitio

Parroquia

SANTA ROSA
Cantón

EL ORO
Provincia

Documento No: 00062930

Fecha de Muestreo: 23/09/2024

Fecha de Ingreso: 08/10/2024

Fecha de Salida: 15/10/2024

Resultados e Interpretación de: ANALISIS NITROGENO TOTAL

Cód. Muestra	Nombre de Muestra	pH	M.O.	N Total	C	C/N	NH4	P	S	NO2	NO3	Fe Total	P Total	C.I.C.
			%	%	Relac.	p.p.m.			%	meq/100				
52276	MUESTRA# 1	0.0	0.00	0.89	0.00	0.00	0.00	30.00	0.0	--	--	--	--	0.0
52277	MUESTRA# 2	0.0	0.00	0.94	0.00	0.00	0.00	47.00	0.0	--	--	--	--	0.0
52278	MUESTRA# 3	0.0	0.00	0.94	0.00	0.00	0.00	57.00	0.0	--	--	--	--	0.0
52279	MUESTRA# 4	0.0	0.00	0.88	0.00	0.00	0.00	54.00	0.0	--	--	--	--	0.0

<u>Interpretación:</u>	<u>Requerimientos de Cal</u>	<u>Interpretación C/N:</u>
pH = 7.5 - 8.5 M.O. = 2.5 - 5.0 % N Total = 0.1 - 0.2 % Fósforo = 18.0 - 25.0	M.O. = < 2 % Medio = 2-4 % Alto = > 4 %	Excesiva liberación de Nitrógeno < 10 Normal liberación de Nitrógeno 10-12 Escasa liberación de Nitrógeno 12-15 Muy escasa liberación de Nitrógeno >15 C/N 8-12

Estos resultados pueden ser sujetos de comparación, siempre y cuando se utilice la misma metodología utilizada en este Laboratorio.

Esta Hoja de Resultados es válida sólo con firma y sello en original.

ING. QUÍMICA ESSENCIA SANCHEZ
Jefe de Laboratorio



Gerente Técnico

ING. NARCISA BENTANCO
Secretaría

F01013R